



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 199 44 870.1

Anmeldetag: 18. September 1999

Anmelder/Inhaber: Aventis Pharma Deutschland GmbH, Frankfurt
am Main/DE

Bezeichnung: Signalsequenzen zur Herstellung von Leu-
Hirudin über Skretion durch E.coli in das
Kulturmedium

IPC: C 07 K, C 12 N

Bemerkung: Die Anmelderin firmierte bei Einreichung dieser
Patentanmeldung unter der Bezeichnung:
Hoechst Marion Roussel Deutschland GmbH

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 21. Juni 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Beschreibung

- 5 Signalsequenzen zur Herstellung von Leu-Hirudin über Sekretion durch *E.coli* in das Kulturmedium

Das vom Blutegel abgeleitete Präparat Refludan® zeigt in der klinischen Prüfung gute therapeutische Eigenschaften (The Lancet, Vol.353, p.429 – 438). Dies läßt
10 den Schluß zu, daß in Zukunft ein größerer Mengenbedarf für das Präparat zu erwarten ist. Der biologische aktive Wirkstoff des Präparates ist das in dem europäischen Patent 0 324 712 beschriebene [Leu¹, Thr²]-63-Desulfato-hirudin, im folgenden kurz „Leu-Hirudin“ genannt.

- 15 In dem europäischen Patent 0 448 093 ist ein Verfahren zur Herstellung von Hirudin beschrieben. Die bevorzugte Ausführung des Patentes umfaßt ein Hirudin, dessen N-terminale Aminosäure aus Alanin besteht. Fusioniert man dieses Hirudin mit der Signalsequenz der α -Cyclodextringlykosyltransferase (CGTase) und transformiert
20 einen dieses Fusionsprotein kodierenden Expressionsvektor , wie in dem Patent beschrieben, in eine *E. coli* Sekretormutante, so kann Ala -Hirudin mit Rohausbeuten von größer 2 Gramm pro Liter hergestellt werden. Das europäische Patent 0 549 915 beschreibt Varianten des Ala - Hirudin mit verbesserter Stabilität. Werden diese Varianten mit dem *E. coli* Sekretor System hergestellt, so ergeben
sich Ausbeuten von mehreren Gramm pro Liter. Die Ausbeuten sind damit deutlich
höher als dies von Dodt *et al* für die Hirudinvariante HV1 beschrieben wurde (FEBS
LETTERS vol. 202 373 –377). Eine im Vergleich dazu unwesentliche Steigerung
der Ausbeute wird im US Patent 5,573,929 beschrieben, indem anstelle des von
Dodt *et al.* pBR322 abgeleiteten Vektors in bekannter Weise die
Expressionskassette über einen pUC – Vektor exprimiert wird. Bender *et al.*
30 (Appl. Microbiol Biotechnol 34, p.203 –207 1990) beschreiben die Sekretion im europäischen Patent 0 171 024 beschriebenen Thr - Hirudins durch *Streptomyces lividans*. Aber auch hier sind die Ausbeuten im Vergleich zu denen in den europäischen Patenten 0 448 093 und 0 549 915 genannten Ausbeuten deutlich

geringer. Dies gilt auch für die Expression in *E.coli* B, wie sie P. de Taxis du Poet et al. für die Sekretion der Hirudinvariante HV1 über die Signalsequenz Ompa von *E. coli* beobachten. Die Autoren finden Ausbeuten von 300mg/ l Hirudin im Periplasma und ca. 40 mg/ l im Zellüberstand. Die in dem Artikel gleichzeitig beschriebene

5 Expression in Insektenzellsystemen ist gering (400 µg/l).

Mit den Hefeexpressionssystemen *Hansenula polymorpha* oder *Pichia pastoris* erzielbaren Ausbeuten kommen den in den europäischen Patenten 0 448 093 und 0 549 915 beschriebenen Ausbeuten im Gegensatz zu denen mit *S. cerevisiae*

10 erzielten Werten am nächsten.

Rosenfeld et al. (Protein Expression and Purification 8 , 476 – 482, 1996) beschreiben die Expression und Sekretion von Hirudin durch die Hefe *Pichia pastoris* . Dabei werden Ausbeuten von ca. 1,5g/l Kulturbrühe erreicht. Eine

15 ähnliche Größenordnung läßt sich mit der Hefe *Hansenula polymorpha* erreichen (Appl. Microbiol. Biotechnol. 44, 377 – 385 1995). Ein erheblicher Nachteil solcher Expressionssysteme liegt aber in deutlich längeren Fermentationszeiten gegenüber dem *E.coli* System. Es wäre also vorteilhaft, wenn Leu –Hirudin wie Ala –Hirudin über Sekretion durch *E.coli* herstellbar wäre.

20 Dies gelingt aber nicht mit dem in dem europäischen Patent 0 448 093 beschriebenen System. Deswegen wird in dem Patent vorgeschlagen, die Leu – Hirudin- Sequenz um das Tripeptid Ala – Thr – Arg zu verlängern, so daß ein Prä – Leu – Hirudin entsteht, das schließlich nach Umsetzung mit Trypsin zu dem nativen

25 Wirkstoff Leu – Hirudin umgewandelt wird. Folgt man diesem Vorschlag , so ergeben sich bereits deutlich schlechtere Rohausbeuten im Schüttelkolben-experiment, als für Ala-Hirudin beschrieben wurde. Damit ist ein eindeutiger Vorteil gegenüber späteren Hefeexpressionssystemen zunächst nicht mehr klar ersichtlich.

30 Die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe war es demgemäß, ein Fusionsprotein herzustellen, bei dem die Kombination aus Signalsequenz und Leu – Hirudin, die direkte Prozessierung zu Leu-Hirudin und anschließende Sekretion von

nativem Leu-Hirudin in hohen Ausbeuten durch *E. coli* erlaubt. Dies ist die Voraussetzung zur Entwicklung eines Verfahrens, das sich sowohl in der Fermentation als auch in der sich anschließenden Reinigung durch die verbesserte Ausgangskonzentration des Hirudin vorteilhaft auf die Herstellkosten von Refludan auswirkt.

Es wurde nun überraschend gefunden, daß Signalsequenzen existieren, die eine direkte Sekretion von Leu-Hirudin durch *E. coli* erlauben und daß dabei sogar eine effizientere Sekretion als im europäischen Patent 0 448 093 beschrieben wurde, beobachtet wird. Damit kann ein Verfahren entwickelt werden, das ohne großen

Aufwand hohe Mengen an Leu-Hirudin zugänglich werden läßt. Dies ist Gegenstand der Erfindung.

Um vorteilhafte Signalsequenzen zu finden, wird eine Methode des PCR gestützten Signalsequenz – Screenings eingeführt. Diese Methode benutzt die das Protein von

Interesse kodierende DNA als Matrize und einen definierten reversen PCR –Primer, sowie variable vorwärts gerichtete Primer, die die Synthese eines DNA-

Abschnittes, der eine Signalsequenz gekoppelt an ein Gen von Interesse kodiert, erlauben. Die Reaktion läuft nach dem in Figur 1 dargestellten Schema ab. Es ist dem Fachmann klar, daß entsprechend der Länge der zu synthetisierenden

Signalsequenz die Zahl der Reaktionsschritte variieren kann. Kurze Signalsequenzen können mit einem Reaktionsschritt, längere Sequenzen mit zwei, drei oder mehr Reaktionen hergestellt werden. Zudem ist die Zahl der Reaktionen auch abhängig von dem zur Synthese der als Primer benutzten Oligonukleotide

verwendeten Gerät. Die so synthetisierte Signalpeptid – Genfusion kann dann gezielt mit den die Restriktionsstellen 1 und 2 erkennenden Enzymen gespalten werden und in einen entsprechend geöffneten Expressionsvektor insertiert werden.

Von allgemeiner Bedeutung wird das System dann, wenn man als Gen von Interesse Hirudin wählt. Die N - terminale Aminosäure von Hirudin kann dabei variabel gewählt werden. Dies führt zwar zu einer gewissen Beeinflussung der

Bindung von Hirudin an Thrombin (Veränderung der Bindungskonstante), jedoch bleibt der inhibitorische Effekt von Hirudin bezüglich der Thrombinaktivität meßbar.

Die Patentschrift EP-B1 0 448 093 beschreibt die Sekretion von Hirudin in den Kulturüberstand. Dort ist die Hirudinkonzentration über den bekannten

Thrombinhemmttest direkt bestimmbar. Die Hirudinkonzentration ist ein direktes Maß für die Effizienz der Sekretion und damit der Abspaltung der Signalsequenz. Das Patent beschreibt aber, daß z.B. Hirudin beginnend mit der Aminosäure Leucin nicht effizient über die Signalsequenz der CGT-ase in den Überstand abgegeben werden

- 5 kann. Mit Hilfe der oben beschriebenen Methode kann man nun nach Signalsequenzen suchen, die dies effektiv erlauben. In ähnlicher Weise kann man nun die Sekretion von Hirudinen, die mit einer der übrigen 19 Aminosäuren beginnen, untersuchen. Man erhält so jeweils ein Spektrum von Signalsequenzen, die modellhaft die effiziente Prozessierung der carboxyterminalen Aminosäure des
- 10 Signalpeptides und den daran anknüpfenden peptidischen Restes erlauben. Damit kann man eine Vorauswahl an Signalpeptiden zur effizienten Sekretion eines beliebigen Proteines in das Periplasma treffen und so die Chance zur Entwicklung eines vorteilhaften Herstellprozesses für ein Protein erhöhen. Dies ist ebenfalls Gegenstand der Erfindung. Man kann das Verfahren beschleunigen bzw.
- 15 automatisieren, indem man das Transformationsgemisch aus Ligationsansatz und kompetenten Zellen als Flüssigkultur in einem Selektionsmedium über Nacht schüttelt und am nächsten Tag mit einem Aliquot der Zellen wie in Beispiel beschrieben Medium, das Induktor enthält zur Durchführung der Induktion beimpft aber den größten Teil der Kultur zentrifugiert und das Zellpellet wegfriert. Findet
- 20 man bei der Expression Hirudinaktivität, so kann man das entsprechende Expressionsplasmid aus den Zellen reisolieren, linearisieren und gelelektrophoretisch von etwaigen Autoligationsprodukten separieren. Die lineare Plasmid DNA wird dann religiert und erneut in den Wirtstamm transformiert. Nun
- 25 kann man einzelne Kolonien isolieren und auf ihre Expressionsleistung testen. Dabei kann man so vorgehen, daß das Verfahren Kriterien der Arzneimittelzulassung erfüllt.

- Ein weiterer Vorteil des Vorgehens besteht darin, daß man verschiedenen Varianten eines Signalpeptides, wie sie im Lauf der Evolution durch Austausch von
- 30 Aminosäuren zwischen einzelnen Spezies entstanden sind, leicht nebeneinander im Hinblick auf ihre Tauglichkeit zur effizienten Sekretion eines Hirudins untersuchen kann.

Auch ist das Verfahren vorteilhaft gegenüber des Einsatzes von Computer Programmen wie von Nielsen *et al.* (Protein Engineering 10, 1-6, 1997) beschrieben, mit deren Hilfe sich Schnittstellen zwischen Signalsequenz und einem Protein von Interesse vorhersagen lassen. Es zeigt sich jedoch, daß die hiermit zu treffenden Voraussagen nicht in jedem Fall zutreffen, so daß leicht vorteilhafte Kombinationen übersehen werden könnten. Zudem besteht zwischen der Voraussage der korrekten Prozessierung und der tatsächlich erzielbaren Ausbeute keine Beziehung.

- 10 Ein Gegenstand der Erfindung ist ein Hirudinvorläufer enthaltend eine Signalsequenz ausgewählt aus der Gruppe enthaltend die Signalsequenzen des äußeren Membranproteins von *Serratia marcescens*, des oprF-Proteins von *Pseudomonas fluorescens*, des lamb B Proteins von *Escherichia coli*, und der Furmarat-Reduktase von *Shewanella putrefaciens*, vorzugsweise ausgewählt wird
- 15 aus der Gruppe enthaltend die Signalsequenz des äußeren Membranproteins von *Serratia marcescens* und der Furmarat Reduktase von *Shewanella putrefaciens*, an welche C - terminal die Sequenz von Leu-Hirudin angefügt ist.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Leu-Hirudin, bei welchem als Zwischenstufe ein Hirudinvorläufer wie oben beschrieben vorkommt, bei dem

- 25 (a) ein Expressionsplasmid enthaltend eine DNA-Sequenz kodierend für den Hirudinvorläufer hergestellt wird;
- (b) das Expressionsplasmid gemäß (a) in einer geeigneten *E. coli* Zelle exprimiert wird;
- 30 (c) der Hirudinvorläufer aus *E. coli* sekretiert und gleichzeitig prozessiert wird; und
- (d) das Leu-Hirudin direkt aus dem Kulturmedium isoliert wird.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung eines Hirudinvorläufers wie oben beschrieben zur Herstellung von Leu-Hirudin, vorzugsweise in einem Verfahren wie oben beschrieben.

- 5 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Ermittlung eines geeigneten Signalpeptids zur sekretorischen Expression eines beliebigen Proteins in *E. coli*, wobei
- (a) Hirudin oder ein Hirudinderivat mit antithrombotischer Wirkung, welches eine definierte Aminosäure As_x an seinem N-Terminus hat, welcher sich N-terminal an ein zu testendes Signalpeptid anschließt, in *E. coli* exprimiert wird;
 - 10 (b) die Expressionsrate durch Messung der Hirudinaktivität im Kulturüberstand bestimmt wird;
 - (c) die Schritte (a) und (b) mit verschiedenen Signalpeptiden wiederholt werden;
 - (d) ein geeignetes Signalpeptid durch Vergleich der durch die gemäß Schritt (b) ermittelten Hirudinaktivitäten repräsentierten Expressionsraten ausgewählt wird.
 - 15

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von Hirudin oder einem Hirudinderivat mit antithrombotischer Wirkung, welches eine definierte Aminosäure As_x an seinem N-Terminus hat, zur Ermittlung eines Signalpeptids, welches die effiziente Sekretion eines Vorläuferproteins bestehend aus dem Signalpeptid und einem beliebigen anderen Protein mit der N-terminalen Aminosäure As_x , bei gleichzeitiger Abspaltung des Signalpeptids aus *E. coli*, ermöglicht, insbesondere wobei As_x gleich Leucin ist.

25

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines beliebigen Proteins durch sekretorische Expression in *E. coli*, wobei

- (a) ein geeignetes Signalpeptid gemäß dem Verfahren zur Ermittlung eines geeigneten Signalpeptids, ermittelt wird;
- 30 (b) ein Nukleinsäurekonstrukt kodierend für ein Vorläuferprotein bestehend aus dem geeigneten Signalpeptid gemäß (a) und dem beliebigen Protein in *E. coli* exprimiert wird; und
- (c) das beliebige Protein aus dem Kulturüberstand isoliert wird,

insbesondere, wobei die N-terminale Aminosäure des gewünschten Proteins Leucin ist und die Expression über ein Nukleinsäurekonstrukt erfolgt, bei welchem die das Signalpeptid umfassende Sequenz kodiert für ein Signalpeptid ausgewählt aus der Gruppe enthaltend das äußere Membranprotein von *Serratia marcescens*, das oprF-Proteins von *Pseudomonas fluorescens*, das lamb B Proteins von *Escherichia coli*,
 5 und die Furmarat-Reduktase von *Shewanella putrifaciens* .

Beispielhaft soll die Synthese von Signalsequenzen, die die effiziente Synthese und Sekretion von Leu-Hirudin erlauben, beschrieben werden. Ebenfalls wird die

10 Synthese anderer Signalsequenzen, die nicht oder hinsichtlich der Ausbeute mit schlechteren Ergebnissen zum Ziel führten, beschrieben. Die Beispiele sollen dabei den Gedanken der Erfindung anhand der Auswahl von Signalsequenzen anhand von Leu-Hirudin erläutern, jedoch nicht darauf beschränkt sein.

15 Beispiel 1 : Synthese eines Fusionsgenes kodierend für ein Fusionsprotein bestehend aus Leu-Hirudin und der Signalsequenz des äußeren Membranproteins aus *Serratia marcescens*

20 Als Expressionsplasmid wird der im europäischen Patent 0 468 539 in Figur 1 beschriebene Vektor pJF118 verwendet, da dieser bzgl. seines Grundgerüsts mit dem im europäischen Patent 0 448 093 beschriebenen Vektor pCM7053 identisch ist.

25 Als Matrize wird das im europäischen Patent 0 448 093 in Beispiel 1 genannte Plasmid pK152 verwendet, das die Hirudinsequenz entsprechend dem europäischen Patent 0 171 024 trägt.

Das Membranprotein wurde von Braun, G. und Cole, S.T: (Mol.Gen.Genet. 195,
 30 321-328 , 1984) beschrieben.

Zur Synthese des gewünschten DNA – Abschnittes werden drei Oligonukleotidsequenzen hergestellt.

Oligonukleotid hirrev hat die Sequenz :

5' TTTTTTTAAG CTTGGGCTGC AGGTC 3' [SEQ ID NO: 1]

Hind3

- 5 Der Primer hybridisiert gegen die Region 227 –210 bp des in der Tabelle 1 dargestellten Hirudingenes.

Primer smompaf1 hat die Sequenz:

- 10 5'-TGGCACTGGC AGGTTTCGCT ACCGTAGCGC AAGCCcttac gtatactgac tgca – 3'
[SEQ ID NO: 2]

- Der Primer hybridisiert gegen die Nukleotide 1-19 der in Tabelle 1 dargestellten Hirudinsequenz. Der hybridisierende Teil der Primersequenz ist mit kleinen Buchstaben symbolisiert. Der Rest der Sequenz hybridisiert gegen die Region 229bp –263 bp der von Braun,G. und Cole,S.T. (Mol. Gen. Genet. 195, 321-328, 1984) publizierten Sequenz.
- 15

Primer smompaf2 hat die Sequenz :

- 20 5'- tttttgaat tcATGAAAAA GACAGCTATC GCATTAGCAG TGGCACTGGC AGGTTTC – 3'
[SEQ ID NO: 3]

- Ab Position 13 bp hybridisiert die Primersequenz mit der von Braun und Cole publizierten Sequenz von 201bp – 245bp und überlappt somit mit der Primersequenz smompaf2. Die Position 1- 12 des Primers enthält eine Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym *EcoR1* sowie angrenzend sechs T-Nukleotide, um die Erkennung durch das Enzym zu ermöglichen.
- 25

- 30 In einer Standard – PCR (wie z.B. 94°C :10'', 50 °C: 30'', 72°C: 45'', 25 Zyklen) mit DNA des Plasmides pK152 als Matrize, das die in Tabelle 1 beschriebene Sequenz trägt, und den Primern hirrev und smompaf1 wird die Hirudinsequenz um die bakterielle Teilsignalsequenz verlängert. Das Reaktionsprodukt wird dann in einer zweiten PCR als Template mit den Primern hirrev und smompaf2 unter gleichen

Bedingungen umgesetzt. Als Reaktionsprodukt entsteht ein DNA-Fragment, das für ein Fusionsprotein kodiert, welches aus der um die gewünschte Signalsequenz verlängerten Hirudinsequenz besteht. Am 5' Ende findet sich die Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym *EcoR1* und am 3' Ende die Erkennungsstelle für das Enzym *Hind3*.

Das Reaktionsprodukt der zweiten PCR wird in einem Doppelverdauansatz mit den beiden Restriktionsenzyme umgesetzt und als *EcoR1/ Hind3* Fragment in die mit den beiden Enzymen geöffnete Vektor DNA in einer T4 – DNA – Ligasereaktion inseriert. Kompetente Zellen des Stammes *E. coli* Mc1061 oder der Sekretor - Mutante WCM100 werden mit dem Ligationsgemisch transformiert und unter Selektionsdruck auf Ampicillin-haltigen Platten vermehrt. Am nächsten Morgen erfolgt dann die Expression gemäß Beispiel 6 im Vergleich zur Ala-Hirudinexpression mit dem Stamm *E. coli* WCM100 / pCM7053. Es zeigt sich, daß die erzielte Expression ca. 1,5 mal besser ist als im Vergleichsversuch.

Beispiel 2 : Synthese des Fusionsproteins aus Leu-Hirudin und der Signalsequenz des *oprF* - Genproduktes aus *Pseudomonas fluorescens*

Die Konstruktion erfolgt entsprechend dem in Beispiel 1 beschriebenen Schema mit Ausnahme, daß anstelle der Primer smompaf1 / f2 zwei neue Primer benutzt werden, die bezüglich ihrer Spezifität für das Hirudingen und der Sequenz zur Erkennung durch das Restriktionsenzym *EcoR1* die gleichen Merkmale wie die smompa –Primer aufweisen, aber für die gewünschte Signalsequenz des *oprF* – Genes (De, E. et al.: FEMS Microbial. Lett. 127, 263 –272 , 1995) kodieren.

Primer pfuf1 hat die Sequenz:

5'GGTTCTCTTA TTGCCGCTAC TTCTTTCGGC GTTCTGGCAc ttacgtatac tgactgca 3'
[SEQ ID NO: 4]

Primer pfuf2 hat die Sequenz :

5'tttttgaat tcatgAAAAA CACCTTGGGC TTGGCCATTG GTTCTCTTAT TGCCGC 3'
[SEQ ID NO: 5]

Dabei wird der Primer pfuf1 entsprechend Beispiel 1 in PCR1 und der Primer pfuf2 entsprechend in der PCR2 verwendet. Die Expression wird im Vergleich zur Ala- Hirudinexpression mit dem Stamm *E. coli* WCM100 / pCM7053 durchgeführt. Es zeigt sich, daß die erzielte Expression ca. 1,1 mal besser ist, als im

- 5 Vergleichsversuch. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung im SDS- PAGE System wird die Hirudinbande isoliert und die N- terminale Sequenz des Hirudins bestimmt. Es zeigt sich, daß die Sequenz vollständig intakt ist und mit der Aminosäure Leucin beginnt. Dies Ergebnis ist überraschend, da das Programm zur Identifikation der putativen Signalpeptidaseerkennungsstelle eine Verlängerung des Hirudins um Valin
- 10 voraussagt.

Beispiel 3 : Synthese des Fusionsproteins aus Leu-Hirudin und der Signalsequenz des lamB Genproduktes aus *E. coli*

- 15 Die Konstruktion erfolgt entsprechend dem in Beispiel 1 beschriebenen Schema mit Ausnahme, daß anstelle der Primer smompaf1 / f2 zwei neue Primer benutzt werden, die bezüglich ihrer Spezifität für das Hirudingen und der Sequenz zur Erkennung durch das Restriktionsenzym *EcoR1* die gleichen Merkmale wie die smompa –Primer aufweisen, aber für die gewünschte Signalsequenz des lamB –
- 20 Genes (Clement, J.M. and Hofnung, M. : Cell 27, 507 –514, 1981) kodieren.

Primer lambbf1 hat die Sequenz:

5' GTTGCCGTCG CAGCGGGCGT AATGTCTGCT CAGGCAATGG CTcttacgta tactgadgc a 3'
[SEQ ID NO: 6]

Primer lambbf2 hat die Sequenz :

5' tttttgaat tcATGATGAT TACTCTGCGC AAActTCCTC TGGCGGTTGC CGTCGCAGC 3'
[SEQ ID NO: 7]

Dabei wird der Primer lambbf1 entsprechend Beispiel 1 in PCR1 und der Primer lambbf2 entsprechend in der PCR2 verwendet. Die Expression wird

im Vergleich zur Ala- Hirudinexpression mit Stamm *E. coli* WCM100 / pCM7053 durchgeführt. Es zeigt sich , daß die erzielte Expression gleich hoch ist wie im Vergleichsversuch. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung im SDS- PAGE System wird die Hirudinbande isoliert und die N- terminale Sequenz des Hirudins bestimmt.

5 Es zeigt sich , daß die Sequenz vollständig intakt ist und mit der Aminosäure Leucin beginnt. Dies Ergebnis ist überraschend, da das Programm zur Identifikation der putativen Signalpeptidaseerkennungsstelle die korrekte Prozessierung von Hirudin nicht voraussagt.

10 Beispiel 4: Synthese des Fusionsproteins aus Leu-Hirudin und der Signalsequenz des Vorläufers der Furmarat Reduktase Flavoprotein Untereinheit aus *Shewanella putrefaciens*

Die Konstruktion erfolgt entsprechend dem in Beispiel 1 beschriebenen Schema mit Ausnahme, daß anstelle der Primer smompaf1 / f2 zwei neue Primer benutzt werden, die bezüglich ihrer Spezifität für das Hirudingen und der Sequenz zur Erkennung durch das Restriktionsenzym *EcoR*1 die gleichen Merkmale wie die smompa –Primer aufweisen, aber für die gewünschte Signalsequenz aus *Shewanella putrefaciens* (Pealing S.L. et al.: Biochemistry 31, 12132 – 12140, 20 1992) kodieren. Da die Publikation nur die Proteinsequenz beschreibt, wird die Aminosäuresequenz entsprechend der Codon – Tabellen in eine DNA – Sequenz übersetzt, so daß sich für den

Primer spfccf1 folgende Sequenz ergibt:

25 5' CTACCCTGAT GGGTACCGCT GGTCTGATGG GTACCGCTGT TGCTcttacg tatactgact gca 3'
[SEQ ID NO: 8]

Primer spfccf2 hat die Sequenz :

30 5'tttttgaat tcATGAAAAA AATGAACCTG GCTGTTTGCA TCGCTACCCT GATGGGTACC 3'
[SEQ ID NO: 9]

Dabei wird der Primer spccf1 entsprechend Beispiel 1 in der PCR1 und der Primer spfccf2 entsprechend in der PCR2 verwendet. Die Expression wird im Vergleich zur

Ala- Hirudinexpression mit Stamm *E. coli* WCM100 / pCM7053 durchgeführt. Es zeigt sich, daß die erzielte Expression ca. 1,5 mal besser ist als im Vergleichsversuch. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung im SDS PAGE System wird die Hirudinbande isoliert und die N - terminale Sequenz des Hirudins bestimmt.

5 Es zeigt sich, daß die Sequenz vollständig intakt ist und mit der Aminosäure Leucin beginnt. Dies Ergebnis ist überraschend, da das Programm zur Identifikation der putativen Signalpeptidaseerkennungsstelle eine Prozessierung carboxyständig zu Cystein in Position 6 der Hirudinsequenz voraussagt.

10 Beispiel 5 : Synthese des Fusionsproteins aus Leu-Hirudin und der Signalsequenz des Vorläufers der β - Laktamase aus pBR322

Die Konstruktion erfolgt entsprechend dem in Beispiel 1 beschriebenen Schema mit Ausnahme, daß anstelle der Primer smompaf1 / f2 zwei neue Primer benutzt werden, die bezüglich ihrer Spezifität für das Hirudingen und der Sequenz zur Erkennung durch das Restriktionsenzym *EcoR*1 die gleichen Merkmale wie die smompa –Primer aufweisen, aber für die gewünschte Signalsequenz des β - Laktamase – Vorläuferproteines (Sutcliffe J.G.; Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43:77-90 (1978)) kodieren.

20

Primer blaf1 hat folgende Sequenz :

5' CTGATCCCGT TCTTTGCAGC GTTCTGCCTG CCGGTTTTTCG CGcttacgta tacgactgc a 3'

[SEQ ID NO: 10]

25

Primer blaf2 hat die Sequenz :

5' tttttgaat tcATGTCCAT CCAGCACTTC CGCGTCGCCC TGATCCCGTT CTTTGC 3'

[SEQ ID NO: 11]

30

Dabei wird der Primer blaf1 entsprechend Beispiel 1 in der PCR1 und der Primer blaf2 entsprechend in der PCR2 verwendet. Die Expression wird im Vergleich zur Ala-Hirudinexpression mit Stamm *E. coli* WCM100 / pCM7053 durchgeführt. Es zeigt sich , daß die erzielte Expressionausbeute nur 50% - 90% der im Vergleichsversuch

erzielten Ausbeute beträgt. Nach gelektrophoretischer Auftrennung im SDS PAGE System wird die Hirudinbande isoliert und die N-terminale Sequenz des Hirudins bestimmt. Es zeigt sich, daß die Sequenz vollständig intakt ist und mit der Aminosäure Leucin beginnt. Dieses Ergebnis wurde durch das Signalpeptid das Programm zur Identifikation der putativen Signalpeptidaseerkennungsstelle eine Prozessierung vorausgesagt.

Beispiel 6 : Synthese des Fusionsgenes aus Leu-Hirudin und der Signalsequenz des Vorläufers der alkalischen Phosphatase aus *E. coli*

Die Konstruktion erfolgt entsprechend dem in Beispiel 1 beschriebenen Schema mit Ausnahme, daß anstelle der Primer smompaf1 / f2 zwei neue Primer benutzt werden, die bezüglich ihrer Spezifität für das Hirudingen und ihrer Sequenz zur Erkennung durch das Restriktionsenzym *EcoR*I die gleichen Merkmale wie die smompa –Primer aufweisen, aber für die gewünschte Signalsequenz des alkalischen Phosphataseproteins aus *E. coli* (Shuttleworth, H., Taylor, J. and Minton, N. Nucleic Acids Res. 14 (21), 8689 (1986)) kodieren.

Primer linkphoaf1 hat folgende Sequenz :

5' GCTGCCGCTG CTGTTACCCC CGGTTACCAA AGCGcttacg tatactgact gca 3'
[SEQ ID NO.: 12]

Primer linkphoaf2 hat die Sequenz :

5' tttttgAAT TCATGAAACA GTCGACCATC GCGCTGGCGC TGCTGCCGCT GCTGTTC 3'
[SEQ ID NO.: 13]

Die beiden Primer sind bzgl. der Codonwahl für *E. coli* optimiert, d.h. sie entsprechen nicht vollständig der natürlichen Sequenz des Ausgangsgenes.

Dabei wird der Primer linkphoaf1 entsprechend Beispiel 1 in PCR1 und der Primer linkphof2 entsprechend in der PCR2 verwendet. Die Expression wird

im Vergleich zur Ala - Hirudinexpression mit dem Stamm *E. coli* WCM100 / pCM7053 durchgeführt. Es zeigt sich, daß die erzielte Expressionausbeute nur ein Bruchteil der im Vergleichsversuch erzielten Ausbeute beträgt. Durch geoelektrophoretische Auftrennung im SDS PAGE System wird die Hirudinbande isoliert und die N- terminale Sequenz des Hirudins bestimmt. Es zeigt sich , daß die Sequenz vollständig intakt ist und mit der Aminosäure Leucin beginnt. Dieses Ergebnis wurde durch das Programm zur Identifikation der putativen Signalpeptidaseerkennungsstelle vorausgesagt. Überraschend ist aber die schlechte Ausbeute.

10

Beispiel 7: Synthese des Fusionsgenes aus Leu-Hirudin und der Signalsequenz des Vorläufers der alkalischen Phosphatase aus *E. fergusonii*

Die Konstruktion erfolgt entsprechend dem in Beispiel 1 beschriebenen Schema mit Ausnahme, daß anstelle der Primer smompaf1 / f2 zwei neue Primer benutzt werden , die bezüglich ihrer Spezifität für das Hirudingen und ihrer Sequenz zur Erkennung durch das Restriktionsenzym *EcoR*1 die gleichen Merkmale wie die smompa – Primer aufweisen, aber für die gewünschte Signalsequenz des alkalischen Phosphataseproteins aus *E. fergusonii* (Du Bose, R.F. and Hartl, D.L. Mol. Biol. Evol. 7, 547-577 (1990)) kodieren.

20

Diese Signalsequenz unterscheidet sich an fünf Positionen von der der alkalischen Phosphatase aus *E. coli*.

25

Primer fergusf1 hat folgende Sequenz :

5' GCTGAGCTGC CTGATCACCC CGGTGTCCCA GGCGcttacg tatactgact gca 3'
[SEQ ID NO.: 14]

30

Primer fergusf2 hat die Sequenz :

5' tttttgaat tcATGAAACA GAGCGCGATC GCGCTGGCTC TGCTgAGCTG CCTGATC 3'
[SEQ ID NO.: 15]

Die beiden Primer sind bzgl. der Codonwahl für *E.coli* optimiert, d.h. sie entsprechen nicht vollständig der natürlichen Sequenz des Ausgangsgenes. Dabei wird der Primer fergusf1 entsprechend Beispiel 1 in PCR1 und der Primer fergusf2 entsprechend in der PCR2 verwendet. Die Expression wird im Vergleich zur Ala - Hirudinexpression mit Stamm *E. coli* WCM100 / pCM7053 durchgeführt. Es zeigt sich , daß die erzielte Expressionausbeute nur ein Bruchteil der im Vergleichsversuch erzielten Ausbeute beträgt. Sie ist nochmals um etwa die Hälfte geringer, als dies für die mit dem Kontstrukt aus Signalpeptid von alkalischer *E.coli* Phosphatase und Leu-Hirudin beobachtet wird.

10

Beispiel 8 : Synthese des Fusionsgenes aus Leu-Hirudin und der Signalsequenz des Vorläufers der Cyclodextrin Glucanotransferase aus *Paenibacillus macerans*

Die Konstruktion erfolgt entsprechend dem in Beispiel 1 beschriebenen Schema mit Ausnahme, daß anstelle der Primer smompaf1 / f2 zwei neue Primer benutzt werden , die bezüglich ihrer Spezifität für das Hirudingen und ihrer Sequenz zur Erkennung durch das Restriktionsenzym *EcoR1* die gleichen Merkmale wie die smompa -Primer aufweisen, aber für die gewünschte Signalsequenz des der Cyclodextrin Glucanotransferase Genes aus *Paenibacillus macerans* (Takano,T., Fukuda,M., Monma,M., Kobayashi,S., Kainuma,K. and Yamane,K. J. Bacteriol. 166, 1118-1122 (1986)) kodieren.

20

Primer baccdgf1 hat folgende Sequenz :

25 5' CTTTCGCTGA GTATGGCGTT GGGGATTTC A CTGCCCCGCAT GGGCActtac
gtatactgac tgca 3' [SEQ ID NO.: 16]

Primer baccdgf2 hat die Sequenz :

30 5' tttttgaat tcATGAAATC GCGGTACAAA CGTTTGACCT CCCTGGCGCT
TTCGCTGAGT ATGGC 3' [SEQ ID NO.: 17]

Dabei wird der Primer baccdgf1 entsprechend Beispiel 1 in PCR1 und der Primer baccdgf2 entsprechend in der PCR2 verwendet. Die Expression wird im Vergleich

zur Ala - Hirudinexpression mit Stamm *E. coli* WCM100 / pCM7053 durchgeführt. Es zeigt sich , daß die erzielte Expressionausbeute ca. ¼ der im Vergleichsversuch erzielten Ausbeute beträgt. Das synthetisierte Hirudin verhält sich im Thrombinhemmtest wie Leu-Hirudin. Dies bedeutet, daß das Signalpeptid korrekt prozessiert wurde. Dies entspricht nicht der Erwartung aus der theoretischen Analyse, die auf einen um 8 Aminosäuren verlängerten oder alternativ um zwei Aminosäuren verkürzten N – Terminus hindeutete.

Beispiel 9 : Synthese des Fusionsgenes aus Leu-Hirudin und der Signalsequenz des *E. coli* PCFO20 Fimbrillin Vorläuferproteins (fotA)

Die Konstruktion erfolgt entsprechend dem in Beispiel 1 beschriebenen Schema mit Ausnahme, daß anstelle der Primer smompaf1 / f2 zwei neue Primer benutzt werden , die bezüglich ihrer Spezifität für das Hirudingen und ihrer Sequenz zur Erkennung durch das Restriktionsenzym *EcoR*1 die gleichen Merkmale wie die smompa –Primer aufweisen, aber für die gewünschte Signalsequenz des *E. coli* PCFO20 Fimbrillin Vorläuferproteins (Viboud, G.I., Jonson, G., Dean-Nystrom, E. and Svennerholm, A.M. Infect. Immun. 64 (4), 1233-1239 (1996)) kodieren.

Primer pcf1-ala hat folgende Sequenz :

5' TGGTTTCAGC TTTAGTAAGC GGGGTTGCAT TTGCTCTTAC GTATACTGAC
TGCAC 3' [SEQ ID NO.: 18]

Primer p-pcf2 hat die Sequenz :

5' TTTTGGGAAT TCATGAAAAA GACAATTATG TCTCTGGCTG TGGTTTCAGC
TTTAGTAAGC 3' [SEQ ID NO.: 19]

Dabei wird der Primer pcf1-ala entsprechend Beispiel 1 in PCR1 und der Primer p-pcf2 entsprechend in der PCR2 verwendet. Die Expression wird im Vergleich zur Ala - Hirudinexpression mit Stamm *E. coli* WCM100 / pCM7053 durchgeführt. Es zeigt sich , daß die erzielte Expressionausbeute ca 40% der im Vergleichsversuch erzielten Ausbeute beträgt.

Beispiel 10 : Synthese des Fusionsgenes aus Leu-Hirudin und der Signalsequenz des *S. typhimurium* Outer Membrane Protein (fimD)

- 5 Die Konstruktion erfolgt entsprechend dem in Beispiel 1 beschriebenen Schema mit Ausnahme, daß anstelle der Primer smompaf1 / f2 zwei neue Primer benutzt werden, die bezüglich ihrer Spezifität für das Hirudingen und ihrer Sequenz zur Erkennung durch das Restriktionsenzym *EcoR*1 die gleichen Merkmale wie die smompa –Primer aufweisen, aber für die gewünschte Signalsequenz des *S.*
- 10 *typhimurium* Outer Membrane Proteins (Rioux, C.R., Friedrich, M.J. and Kadner, R.J.; J. Bacteriol. 172 (11), 6217-6222 (1990)) kodieren.

Primer styfimf1 hat folgende Sequenz :

- 15 5' CGGCGCTGAG TCTCGCCTTA TTTTCTCACC TATCTTTTGC Ccttacgtat actgactgca 3'
[SEQ ID NO.: 20]

Primer styfimf2 hat die Sequenz :

- 20 5' tttttgaat tcaTGTCATT TCATCACCGG GTATTAAAC TGTCGGCGCT GAGTCTC 3'
[SEQ ID NO.: 21]

Dabei wird der Primer styfimf1 entsprechend Beispiel 1 in PCR1 und der Primer styfimf2 entsprechend in der PCR2 verwendet. Die Expression wird im Vergleich zur Ala - Hirudinexpression mit Stamm *E. coli* WCM100 / pCM7053 durchgeführt. Es zeigt sich, daß die erzielte Expressionausbeute ca 10% der im Vergleichsversuch erzielten Ausbeute beträgt.

- 30 Beispiel 11: Expression in *E. coli*

Das Beispiel beschreibt die Expression des Hirudin. Dazu werden je 1 –5ml LB-Medium, das 25mg/l Ampicillin enthält und 0,5 - 2mM IPTG (Isopropyl β -D-Thiogalactopyranoside) mit Zellen einer Transformante beimpft und ca. 20 Stunden

bei 28°C im Brutschüttler bei 220 rpm geschüttelt. Anschließend wird nach Bestimmung der optischen Dichte die Zellsuspension zentrifugiert und Hirudin aus dem klaren Überstand bestimmt.

- 5 Parallel zur Expression von Refludan wird die Expression des in dem europäischen Patent 0 448 093 beschriebene Ala- Hirudin über das Plasmid pCM7053 in der in dem Patent beschriebenen Sekretormutante WCM100 durchgeführt. Damit wird ein direkter Vergleich der Expressionsrate möglich.
- 10 Die Expression im größeren Maßstab kann entsprechend dem US Patent 5,616,476 erfolgen. Refludan kann dann entsprechend der in diesem Patent in den Beispielen 5 und 6 beschriebenen Methoden gereinigt werden.

Beispiel 12 : Bestimmung der Hirudinkonzentration

- 15 Die Bestimmung der Hirudinkonzentration wird entsprechend der Methode von Griebach *et al.* (Thrombosis Research 37, 347 –350 , 1985) durchgeführt. Dazu werden definierte Mengen eines Refludanstandards zur Erstellung einer Eichkurve in die Meßreihe mit einbezogen . Damit kann die Ausbeute direkt in mg /l angegeben
- 20 werden.

25

30

35

40

Tabelle 1 : Kodierende DNA – Sequenz für Hirudin mit Übersetzung in Aminosäuren

5
 1 CTTACGTATACTGACTGCACTGAATCTGGTCAGAACCTGTGCCTGTGCGAAGGATCTAAC 60
 L T Y T D C T E S G Q N L C L C E G S N -

10 61 GTTTGCGGCCAGGGTAACAAATGCATCCTTGGATCCGACGGTGAAAAGAACCAGTGCCTT 120
 V C G Q G N K C I L G S D G E K N Q C V -

15 121 ACTGGCGAAGGTACCCCGAAACCGCAGTCTCATAACGACGGCGACTTCGAAGAGATCCCT 180
 T G E G T P K P Q S H N D G D F E E I P -

20 181 GAGGAATACCTTCAGTAATAGAGCTCGTCGACCTGCAGCCCAAGCTT 227

[SEQ ID NO.:22] ---
 E E Y L Q * * ----- -

25 [SEQ ID NO.: 23]

30

Tabelle 2:

Beispiel	Signalsequenz	Primärstruktur	Relative Ausbeute pro ml Kultur	SEQ ID NO.:
-	Kontrolle : cgtase -Ala – Hirudin	MKRNRRFFNTS AAIAISIALNTFF CSMQTIA	1	24
1	äußeres Membranprotein / <i>Serratia marcescens</i>	MKKTALALAVALAGFATVAQ A	1,5	25
2	opRF – Protein / <i>Pseudomonas fluorescens</i>	MKNTLGLAIGSLIAATSFGV LA	1,1	26
3	lambB –Protein / <i>E.coli</i>	MMITLRKLPL AVAVAAGVMS AQAMA	1	27
4	Fummat Reduktase / <i>Shewanella putrefaciens</i>	MKKMNLAVCI ATLMGTAGLM GTAVA	1,5	28
5	β - Lactamase / pBR322	MSIQHFRVAL IPFFAAFSPLPVFA	0.5	29
8	alk. Phosphatase / <i>E.coli</i>	MKQSTIALAL LPLLFTPVTK A	0,1	30
9	alk. Phosphatase / <i>E. fergusonii</i>	MKQSAIALAL LSCLITPVSQ A	0,05	31
10	Cyclodextrin Glucotransferase / <i>Paenibacillus macerans</i>	MKSRYKRLTS LALSLSMALGI SLPWA	0,25	32
11	Outer Membrane Protein / <i>S. typhimurium</i>	MSFHHRVFKL SALSLALFSH LSFA	0,11	33

1. Hirudinvorläufer enthaltend eine Signalsequenz ausgewählt aus der Gruppe enthaltend die Signalsequenzen des äußeren Membranproteins von *Serratia marcescens*, des oprF-Proteins von *Pseudomonas fluorescens*, des lamb B Proteins von *Escherichia coli*, und der Furmarat-Reduktase von *Shewanella putrefaciens*, an welche C-terminal die Sequenz von Leu-Hirudin angefügt ist.
2. Hirudinvorläufer gemäß Anspruch 1, wobei die Signalsequenz ausgewählt wird aus der Gruppe enthaltend die Signalsequenz des äußeren Membranproteins von *Serratia marcescens* und der Furmat Reduktase von *Shewanella putrefaciens*.
3. Verfahren zur Herstellung von Leu-Hirudin, bei welchem als Zwischenstufe ein Hirudinvorläufer gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2 vorkommt, bei dem
 - (a) ein Expressionsplasmid enthaltend eine DNA-Sequenz kodierend für den Hirudinvorläufer hergestellt wird;
 - (b) das Expressionsplasmid gemäß (a) in einer geeigneten *E. coli* Zelle exprimiert wird;
 - (c) der Hirudinvorläufer aus der *E. coli* sekretiert und gleichzeitig prozessiert wird; und
 - (d) das Leu-Hirudin aus dem Kulturmedium isoliert wird.
4. Verwendung eines Hirudinvorläufers gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2 zur Herstellung von Leu-Hirudin.
5. Verwendung eines Hirudinvorläufers gemäß Anspruch 4 in einem Verfahren gemäß Anspruch 3.
6. Verfahren zur Ermittlung eines geeigneten Signalpeptids zur sekretorischen Expression eines beliebigen Proteins in *E. coli*, wobei

- (a) Hirudin oder ein Hirudinderivat mit antithrombotischer Wirkung, welches eine definierte Aminosäure As_x an seinem N-Terminus hat, welcher sich N-terminal an ein zu testendes Signalpeptid anschließt, in *E. coli* exprimiert wird;
- (b) die Expressionsrate durch Messung der Hirudinaktivität im Kulturüberstand bestimmt wird;
- (c) die Schritte (a) und (b) mit verschiedenen Signalpeptiden wiederholt werden;
- (d) ein geeignetes Signalpeptid durch Vergleich der durch die gemäß Schritt (b) ermittelten Hirudinaktivitäten repräsentierten Expressionsraten ausgewählt wird.

10

7. Verwendung von Hirudin oder einem Hirudinderivat mit antithrombotischer Wirkung, welches eine definierte Aminosäure As_x an seinem N-Terminus hat, zur Ermittlung eines Signalpeptids, welches die effiziente Sekretion eines Vorläuferproteins bestehend aus dem Signalpeptid und einem beliebigen anderen Protein mit der N-terminalen Aminosäure As_x , bei gleichzeitiger Abspaltung des Signalpeptids aus *E. coli*, ermöglicht.

15

8. Verwendung gemäß Anspruch 6, wobei As_x gleich Leucin ist.

20

9. Verfahren zur Herstellung eines beliebigen Proteins durch sekretorische Expression in *E. coli*, wobei

- (a) ein geeignetes Signalpeptid gemäß dem Verfahren nach Anspruch 6 ermittelt wird;
- (b) ein Nukleinsäurekonstrukt kodierend für ein Vorläuferprotein bestehend aus dem geeigneten Signalpeptid gemäß (a) und dem beliebigen Protein in *E. coli* exprimiert wird; und
- (c) das beliebige Protein aus dem Kulturüberstand isoliert wird.

25

30

10. Verfahren zur Herstellung eines beliebigen Proteins in *E. coli* gemäß Anspruch 9, wobei die N-terminale Aminosäure des gewünschten Proteins Leucin ist und die Expression über ein Nukleinsäurekonstrukt erfolgt, bei welchem die für das Signalpeptid kodierende Sequenz kodiert für ein Signalpeptid ausgewählt aus der Gruppe enthaltend das äußere Membranprotein von *Serratia marcescens*, das oprF-

Proteins von *Pseudomonas fluorescens*, das lamb B Proteins von *Escherichia coli*,
und die Furmarat-Reduktase von *Shewanella putrifaciens*.

Zusammenfassung:

HMR 99/L 055

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf einen Hirudinvorläufer enthaltend eine Signalsequenz und die Sequenz von Leu-Hirudin, seine Herstellung und

- 5 Verwendung, sowie ein Verfahren zur Ermittlung von Signalsequenzen für die sekretorische Expression von beliebigen Proteinen in *E. coli* und Verfahren zur sekretorischen Expression beliebiger Proteine in *E. coli*.

Figur 1:

Reaktion 1

